

Celem projektu jest zbadanie procesów naprawy DNA w indukowanej embriotoksycznie i teratogenno chlochlorkiem metylort i niskim poziomie tlenu, w modelu wczesnego rozwoju ludzkich indukowanych komórek pluripotencjalnych. Odkrycie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC) budziło wiele emocji. Opracowana metoda indukcji pluripotencjalno i pozwoliła bowiem na otrzymanie komórek o podobnym potencjale rozwojowym do ludzkich zarodkowych komórek macierzystych z komórek somatycznych od osobników dorosłych. Zmian fenotypu komórek somatycznych umożliwiło wprowadzenie czynników transkrypcyjnych: OCT3/4, SOX2, NANOG, KLF4 oraz c-MYC, które spowodowały po dane zamiany genetyczne, epigenetyczne oraz metaboliczne. Badania z zastosowaniem mikromacierzy wykazały znaczne podobie stwo na poziomie molekularnym komórek uzyskanych dzi ki reprogramowaniu do zarodkowych komórek macierzystych.

Cech charakterystyczn komórek pluripotencjalnych jest zdolno do ró nicowania we wszystkie typy komórek organizmu. Funkcjonalnie przejawia si to zdolno do formowania tzw. kul zarodkowych (EBs), generacj zarodków chimerowych po iniekcji komórki pluripotencjalnej do blastocysty oraz tworzeniem potworków po podaniu podskórnym myszom immunokompetentnym. Uzyskanie komórek iPS stanowi du y przełom w rozwoju medycyny regeneracyjnej, poniewa otwiera perspektywy wprowadzenia terapii spersonalizowanej z zastosowaniem komórek o praktycznie nieograniczonym potencjale rozwojowym.

Ludzkie zarodkowe komórki macierzyste pierwszy raz uzyskano w latach 90-tych z: zarodków nadliczbowych pochodz cych z zapłodnienia in vitro. W Polsce obowi zuj o restrykcyjne przepisy prawne, które zakazuj pracy z zarodkowymi komórkami macierzystymi i dotyczy to zarówno linii nowych jak równie linii wyprowadzonych w latach 90-tych. Prawodawstwo zakazuje pozyskiwania oraz wszelkich bada na ludzkich zarodkowych komórkach macierzystych, w zwi zku z czym brak jest modelu komórek ludzkich do bada nad embriotoksyczo i oraz teratogenno i in vitro. Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste dzi ki podobie stwu do zarodkowych komórek macierzystych umo liwiaj badania, w których mo na modelowa najwcz niejsze etapy rozwoju ludzkiego zarodka bez kontrowersyj etycznych. Badania takie mog mie kolosalne znaczenie dla lepszego poznania molekularnych podstaw wczesnego rozwoju zarodkowego i oceny wra liwo ci zarodka ludzkiego na działanie niekorzystnych warunków rodowiska, mi dzy innymi substancji wpływaj cych na rozwój O rdkowego Układu Nerwowego człowieka. Komórki iPS s stosowane obecnie w tworzeniu modeli chorób in vitro oraz w badaniach podstawowych toksykologicznych i farmakologicznych. W bazie danych ClinicalTrials.gov znajduj si informacje na temat rozpocz tych na wiecie 10 prób klinicznych z zastosowaniem ludzkich komórek iPS, przy czym tylko dwie dotycz podawania komórek pacjentom, pozostałe za dotycz wyprowadzania modeli okre lonych chorób, mi dzy innymi schorze układu nerwowego. Komórki pluripotencjalne, zarówno zarodkowe jak i indukowane nie s bez wad. Podstawowym problemem jest ich mała stabilno genetyczna oraz zdolno do tworzenia teratom, co bezpo rednio wi e si z bezpiecze stwem terapii z zastosowaniem tych komórek. Tworzeniu teratom mo na przeciwdziała przeszczepiaj c populacj komórek zró nicowanych, natomiast problem stabilno ci genetycznej komórek iPS w ró nych warunkach otaczaj cego rodowiska wymaga szeregu bada podstawowych, które do tej pory nie były jeszcze przeprowadzone. Pierwsze komórki iPS wyprowadzono przy pomocy retrowirusów, szybko jednak okazało si , e tworz one guzy zło liwe u myszy immunokompetentnych z powodu mutagenezy insercyjnej. W reprogramowaniu wykorzystano za dwa protoonkogeny: c-MYC oraz KLF4 oraz wyciszenie genu p53. Wymienione czynniki pełni za bardzo wa n funkcj w rozwoju nowotworów. Obecnie znane s metody „nieintegracyjne” otrzymywania komórek iPS jak równie takie, w których mo na pomin stosowanie protoonkogenow. Jednak e ze wzgl du na wysoki potencjał aplikacyjny komórek iPS w medycynie regeneracyjnej i ich wyj ciow niestabilno genetyczn niezbdne jest lepsze poznanie mechanizmów naprawy DNA w tych komórkach, zwłaszcza, e badania kliniczne z zastosowaniem komórek iPS ju trwaj . Coraz wi cej bada nad komórkami iPS wskazuje na wa n rol obni onego poziomu tlenu w ró nicowaniu tych komórek. Obni ony poziom tlenu promuje ró nicowanie oraz korzystnie wpływa na uzyskiwanie komórek o po danym fenotypie, jednak w przypadku komórek nowotworowych powoduj represj genów naprawy DNA, dlatego w tym projekcie tak wa y jest aspekt bada w warunkach obni onego poziomu tlenu.

Chlorek metylort i jest dobrze przebadanym zwi zkiem toksycznym sklasyfikowanym jako neurotoksyna rozwojowa, tzn działa szczególnie toksycznie na komórki tkanki nerwowej w czasie jej wczesnego rozwoju. Wa n jego cech jest generacj ró nego rodzaju uszkodze DNA, jest wi c odpowiedni do badania procesów uszkodzenia oraz naprawy DNA. Realizacja projektu: „Embriotoksyczo i oraz teratogenno chlorku metylort i: wpływ chlorku metylort i oraz obni onego poziomu tlenu” pozwoli na okre lenie ekspresji genów naprawy DNA w „etycznym modelu zarodka ludzkiego” w rodowisku tlenowym zbli onym do warunków jego rozwoju. W modelu ludzkich zarodkowych komórek macierzystych udowodniono niekorzystny wpływ 71 substancji teratogennych. Podobie stwo komórek iPS do ESC sprawia, e bez niszczenia ludzkiego zarodka za pomoc komórek iPS mo na okre li potencjalny wpływ teratogeny badanego zwi zku. Ze wzgl du na znaczne ograniczenie bada na zwierz tach wynikaj ce z prawodawstwa oraz promocje rozwoju modeli alternatywnych w toksykologii, komórki iPS stanowi bardzo wa ny model, który pozwala uzyska unikaln wiedz na temat naprawy DNA na etapie wczesnego rozwoju, bez konieczno ci stosowania ludzkich komórek zarodkowych. Model jest mało przebadany, pomimo e jest cenny dla rozwoju toksykologii in vitro, w szczególno ci w krajach w których badania na ludzkich embrionalnych komórkach macierzystych jest zakazana prawnie. Teratogenno i oraz embriotoksyczo chlorku metylort i wykazana in vivo oraz in vitro na komórkach ESC wymaga potwierdzenia z komórkami iPSC, co zwi kszy wiarygodno „etycznego modelu zarodka ludzkiego”.

Badania podstawowe, które b d realizowane w projekcie dotycz : oceny cytotoxyczo ci, genotoxyczo ci, apoptozy, analizy uszkodzenia DNA oraz ekspresji genów naprawy DNA i hipoksji mierzonych metod PCR w czasie rzeczywistym.

Uzyskana wiedza pozwoli równie na okre lenie roli chlorku metylort i w zaburzeniu ekspresji genów naprawy DNA w warunkach fizjologicznego poziomu tlenu, co mo e by bardzo wa ne w poznaniu roli chlorku metylort i w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych.